

# CAPÍTULO X

## MODELOS DE PREDICCIÓN Y SIMULACIÓN DE PROCESOS Y SU APLICACIÓN EN EL CAMPO DE LA BIOCATÁLISIS

Andrés Rafael Alcántara León y José María Sánchez Montero

### RESUMEN

No todas las síntesis químicas tradicionales pueden ser sustituidas por procesos biocatalíticos, debido a la complejidad de la integración de los procesos y a un análisis de costo/beneficio no siempre favorable. El uso de la modelización y las técnicas de simulación constituye una poderosa herramienta para ayudar a concretar este desafío, puesto que las rutas alternativas y los cambios hipotéticos respecto a los procesos ya existentes se pueden explorar *in silico*, antes de la experimentación. Los modelos desarrollados en el campo de la Biocatálisis se pueden clasificar en cuatro áreas diferentes, según su nivel de aplicación y complejidad: catalizador, reacción, reactor y proceso.

**Palabras clave:** Biocatálisis; Enzimas; Modelización molecular; Catalizador; Reacción; Reactor; Procesos optimizados

### ABSTRACT

*Predictive models and process simulation and its application in Biocatalysis*

Not all traditional chemical synthesis can be replaced by biocatalytic processes, due to the complexity of integration of processes and a cost / benefit ratio. The use of modeling and simulation techniques is a powerful tool to help in this challenge, since the alternative routes and hypothetical changes regarding existing processes can be explored *in silico*, before experimentation. The models developed in the field of Biocatalysis can be classified into four

different areas depending on their level of application and complexity: catalyst, reaction, reactor and process.

**Keywords:** Biocatalysis; Enzymes; Molecular modeling; Catalyst; Reaction; Reactors; Optimized processes.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los procesos biocatalíticos, que implican el uso de una o más enzimas (tanto en forma soluble como células enteras, o en alguna forma de inmovilización) para catalizar reacciones químicas, han encontrado una aplicación importante en el sector farmacéutico para la síntesis de moléculas ópticamente activas y de alto valor añadido (“fine chemicals”) (1). En efecto, la aplicabilidad y la utilidad de la biocatálisis en este sector sin duda va a aumentar a medida que aumente la complejidad estructural de las moléculas cuyo uso terapéutico se pretende. Así, la biocatálisis permite la conversión altamente regio y estereoselectiva de moléculas multifuncionales en condiciones muy suaves, evitando de esta manera el empleo de múltiples pasos de protección y desprotección (2). Además, el uso de condiciones de reacción moderadas, por lo general en un medio acuoso, también permite una mejora significativa desde el punto de vista medioambiental de muchos procesos (3). Recientemente, se ha constatado un incremento en la aplicación de la biocatálisis en la síntesis de productos de bajo valor añadido (“bulk chemicals”), impulsado sin duda por la necesidad de protección medioambiental y el desarrollo de procesos sintéticos más sostenibles, evitando el uso de reactivos peligrosos y desarrollando rutas sintéticas basadas en materias primas renovables, según los principios de la Química Sostenible (4). Sin embargo, no todas las síntesis químicas tradicionales podrían ser candidatas para su sustitución por procesos biocatalíticos, debido a la complejidad de la integración de los procesos y a un análisis de costo/beneficio desfavorable. La evaluación de los casos más adecuados es, por tanto, un reto importante para la implementación de los procesos biocatalíticos.

En este sentido, el uso de la modelización y las técnicas de simulación constituyen una herramienta poderosa para ayudar a concretar este desafío, puesto que las rutas alternativas y los cambios hipotéticos respecto a los procesos ya existentes se pueden explorar *in silico*, previamente a la experimentación (5). Esto permite por tanto, que la misma pueda ser dirigida y centrada y se acelera así el desarrollo de los bioprocesos. Por último, pero no por ello menos importante, señalaremos que los modelos calculados de procesos, también pueden ser utilizados para desarrollar y evaluar estrategias de control que garanticen la estabilidad y la eficiencia deseada. El desarrollo de dichas estrategias de control de procesos para garantizar una calidad fiable del producto final, es especialmente relevante para el sector farmacéutico, tal y como marcan las directrices de la Tecnología Analítica de Procesos (Process Analytical Technology, PAT) dictadas por la FDA, para la consecución de dichos objetivos (6).

En resumen, un buen objetivo de trabajo consistiría en identificar las áreas significativas para seguir avanzando en los modelos y en su aplicación en el campo de la biocatálisis. En este sentido, los modelos desarrollados en el campo de la biocatálisis se pueden clasificar en cuatro áreas diferentes, según su nivel de aplicación (o condiciones de contorno):

**1.- Catalizador:** Se trataría de proponer modelos que describan la catálisis a nivel molecular, permitiendo una predicción acertada de la selectividad de la reacción .

**2.- Reacción:** Modelos cinéticos que describan el mecanismo y velocidades intrínsecas basándose en una serie de variables tales como la concentración, pH y temperatura.

**3.- Reactor:** Modelos cinéticos que describan la cinética de la reacción observada en los reactores, incorporando tanto balances de materia como condiciones hidrodinámicas (mezcla, transporte, etc.).

**4.- Proceso:** Modelos para el análisis de los resultados globales del proceso, incluyendo las interacciones entre las diferentes unidades de operación

implicadas en un diagrama de flujo del proceso, por ejemplo, la reacción enzimática, cristalización, separación, granulación, etc.

La interacción entre estos modelos se muestra en la Figura 1, donde se ve claramente que cada modelo tiene unos límites concretos y unos puntos focales bien definidos.

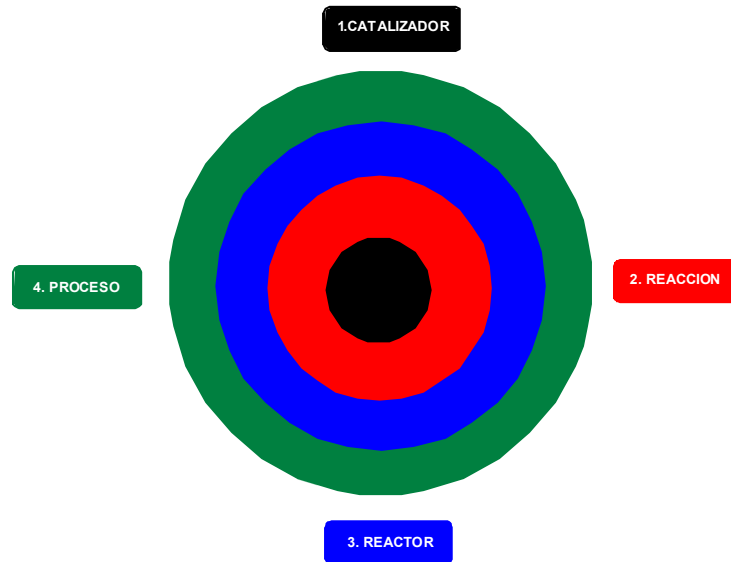


Figura 1.- Representación esquemática de los diferentes modelos aplicados en biocatálisis, en orden creciente de complejidad. Adaptado de Sin, G. y cols., *Biotechnol. Progr.* 2009, 25 (6), 1529-1538.

Así, progresando desde el nivel molecular, cada nivel sucesivo se construye basándose en el anterior, de manera que todos ellos llevan al modelado global del proceso. Obviamente, la complejidad de los modelos aumenta a medida que nos movemos hacia el exterior de los círculos concéntricos, aunque se pueden usar ciertas simplificaciones para hacer más simple el modelado (por ejemplo, asumir modelos cinéticos tipo Michaelis Menten en el nivel 2). El objetivo del modelado del catalizador (nivel 1), es el conocimiento de la estructura molecular de la enzima, para utilizarlo como base de la predicción de su selectividad. Por su parte, los modelos de reacción, reactor y proceso (niveles 2, 3 y 4), tienen como objetivo la optimización de la reacción global, por lo que presentan un gran interés para los ingenieros a la hora de desarrollar, definir y escalar nuevos bioprocesos. En este sentido, el modelado a niveles 2 y 3 pretende describir la velocidad de la reacción biocatalizada, a partir de las velocidades iniciales obtenidas de los experimentos clásicos de variación de concentraciones relativas de sustrato y

enzima. Finalmente, el modelado del proceso (nivel 4), usa los datos previos para describir todas las unidades físicas que intervienen en la reacción (reservorios, reactor, etc.) y unir estos modelos con otros submodelos que describan otras unidades del proceso, tales como cristalizadores, separadores, destiladores, etc., para de esta manera determinar el comportamiento global de todo el sistema, con el objetivo de cuantificar y predecir el rendimiento final.

A continuación, pasaremos a comentar de manera detallada los diferentes niveles, de manera detallada para el nivel 1, y de manera integrada para los otros niveles.

## 2. NIVEL 1. MODELOS DEL CATALIZADOR

Al igual que la Química Orgánica, que ha evolucionado a partir de una descripción empírica hasta una disciplina basada en el mecanismo y una ciencia basada en la estructura, la Biocatálisis también está evolucionando hasta un diseño racional de la ciencia basada en la estructura. El comienzo de la Biocatálisis estuvo igualmente marcado por aproximaciones empíricas, tales como el cribado de muestras (conocido con el término *screening*) o simples extrapolaciones a partir de sustratos conocidos. Independientemente de que las técnicas de screening sigan siendo herramientas válidas en Biocatálisis, los recientes avances en el conocimiento de las estructuras tridimensionales de las enzimas abren la posibilidad de realizar un diseño racional de nuevas reacciones y nuevos catalizadores. En este sentido, el Modelado Molecular puede ayudarnos a responder a importantes preguntas que se plantean al llevar a cabo un proceso biocatalizado (7): i) Explicar a nivel molecular el comportamiento, en muchos casos conocido de una enzima. ii) Sugerir cómo cambia la selectividad de una reacción por modificación del sustrato, enzima o condiciones de reacción. iii) Predecir cuantitativamente el grado de estereoselectividad de una reacción catalizada por una enzima.

Las distintas técnicas computacionales, se han ido desarrollando en estos últimos años, en función del conocimiento de la estructura tridimensional tanto del ligando como del receptor, como se recoge en la Tabla I.

**TABLA I.- Evolución de las técnicas computacionales en función del conocimiento del receptor**

<i>ESTRUCTURA DEL LIGANDO</i>	<i>ESTRUCTURA DEL RECEPTOR</i>	
	<i>CONOCIDA</i>	<i>DESCONOCIDA</i>
<i>CONOCIDA</i>	Interacciones ligando-receptor	Modelos de farmacóforos
	Dinámica Molecular y Técnicas de <i>Docking</i>	Búsquedas 3D basadas en el ligando/ farmacóforo
		QSAR 2D y 3D
<i>DESCONOCIDA</i>	Diseño <i>de novo</i>	Generar estructuras en 3D
	Búsquedas 3D basadas en el diseño	Medidas de Similitud y Diversidad Molecular
		Química Combinatoria

Por ejemplo, las dos estrategias seguidas habitualmente en modelado cuando se pretende el diseño de un nuevo fármaco que actúa sobre un determinado receptor (perfectamente extrapolables a la interacción sustrato-enzima) son las denominadas directas e indirectas. En la primera, se requiere el conocimiento de las características tridimensionales de un receptor, y se interpreta la actividad o inactividad de las moléculas en términos de complementariedad con el receptor. Esto es lo que se conoce por el término de *docking* (podría traducirse como *ataque*, aplicado a un barco que entrase en un puerto, aunque generalmente se emplea el término inglés) o estudios de interacción entre fármaco y receptor. La segunda estrategia, en la que la estructura tridimensional del receptor biológico no es conocida, se basa en el análisis comparativo de las características estructurales de sustancias conocidas activas o inactivas con el fin de definir un farmacóforo apropiado para la actividad biológica estudiada, siendo la aplicación más destacada el conocido como Relaciones Cuantitativas Estructura Actividad en tres

dimensiones (QSAR 3D). Estos avances en ciencias computacionales nos permiten en este sentido describir en detalle la maquinaria del biocatalizador.

No obstante, la predicción cuantitativa *in silico* de la actividad enzimática y la selectividad, sigue siendo un objetivo de gran interés en Biocatálisis. Así, los estudios de las dos últimas décadas han demostrado cómo las enzimas pueden utilizarse adecuadamente, tanto en disolución acuosa como en entornos no convencionales, lo que permite nuevas metodologías por desarrollar, incluso en condiciones experimentales más extremas (8).

Estos avances, han beneficiado en gran medida el desarrollo del Modelado Molecular, al simular algunos de los fenómenos que tienen lugar a nivel molecular durante la Biocatálisis, proporcionando así la base para el diseño de estrategias racionales en la experimentación. Las simulaciones moleculares nos ayudan a la construcción de modelos virtuales de sistemas químicos. El principal interés del Modelado Molecular en Biocatálisis, es el conocimiento a nivel molecular de las interacciones enzima-sustrato, generalmente, tal y como comentamos anteriormente, persiguiendo como meta la predicción de la actividad y selectividad. Hay distintos algoritmos que nos sirven para predecir el *docking* de un sustrato en el centro activo de una enzima, así como para calcular su energía de interacción y para la simulación de su energía de solvatación. La aplicación de estos métodos a la Biocatálisis está basada en el cálculo de la energía libre de la reacción que a su vez deriva de la simulación del estado de transición, como veremos más adelante.

Cuando los fenómenos son demasiado complejos para ser simulados, puede servir de ayuda otros métodos de cálculo, tales como la Quimiometría, porque son capaces de extraer información relevante a partir de datos experimentales y, finalmente, permiten la construcción de modelos de predicción del comportamiento de la enzima. Definimos la Quimiometría, como la ciencia de las mediciones realizadas sobre un sistema o proceso químico por aplicación de métodos matemáticos o estadísticos. Consta de una serie de técnicas heterogéneas, entre las cuales el diseño estadístico de experimentos y análisis estadísticos multivariante son los más importantes para la aplicación en la Biocatálisis.

Hemos de señalar, que los métodos quimiométricos y el Modelado Molecular utilizan aproximaciones radicalmente opuestas a la hora de construir modelos predictivos; así, mientras los primeros establecen relaciones empíricas entre los parámetros operacionales y la variable medida (actividad, estereoselectividad, estabilidad...), sin ninguna presunción de modelos, el Modelado Molecular utiliza unas bases teóricas previas antes de establecer sus predicciones. No obstante, estas dos estrategias no son excluyentes, sino complementarias (9), como veremos posteriormente (apartado 8).

A continuación, procederemos a exponer de manera algo más detallada algunos aspectos en los cuales el Modelado Molecular ha contribuido al desarrollo de la Biocatálisis.

### **2.1. Reconocimiento enzima- sustrato y selectividad de la enzima**

Las técnicas de Modelado Molecular, se han convertido en herramientas de rutina en la descripción de las interacciones enzima-sustrato. Otros temas de interés, tales como la mejora de la estabilidad de la enzima, o la interpretación racional del efecto del disolvente sobre las reacciones biocatalizadas se han investigado en menor proporción. En el primer caso, esto se debe a que la estabilización de la enzima se consigue más a menudo a través de diferentes rutas (por ejemplo, mediante Evolución Dirigida). El problema del efecto del disolvente sin duda merece una atención especial, por lo que se comentará más adelante (ver apartado 2.6).

La mayoría de los estudios computacionales realizados en el campo de la Biocatálisis, se concentran en la predicción de la selectividad de la enzima. Esto implica el cálculo de la constante de especificidad ( $k_{cat}/K_M$ ), que depende de la energía libre del estado de transición de la reacción. En este sentido, los denominados métodos *ab initio* de la Mecánica Cuántica (QM,) son capaces de reproducir los datos experimentales sin emplear parámetros empíricos. La calidad de un cálculo *ab initio*, depende de la base mínima usada para el cálculo, y por su parte, la decisión del tipo de base que debe aplicarse dependerá del objetivo del cálculo y del tipo de molécula por estudiar. Conviene resaltar, que la utilización de bases de cálculo muy sofisticadas no siempre garantiza una buena concordancia con los datos experimentales. Aunque los



métodos *ab initio* de la QM proporcionan tanto la precisión más alta para la simulación molecular, como la posibilidad de contemplar efectos electrónicos, la complejidad del cálculo restringe sus aplicaciones a dianas químicas a nivel de unas pocas decenas de átomos. Por tanto, la complejidad de un sistema biocatalítico limita drásticamente la posibilidad de aplicar métodos de QM, forzando a la Química Computacional hacia el uso de métodos de Mecánica Molecular Clásica (MM), basados en un conjunto de ecuaciones y parámetros denominados Campos de Fuerza.

Así, la MM considera los átomos de una molécula como un conjunto de masas interaccionando vía fuerzas armónicas o elásticas, donde los átomos son tratados como bolas de diferentes tamaños (según el tipo de átomo) y los enlaces se consideran muelles. Esto permite la simulación de macromoléculas, es decir, proteínas; no obstante, la naturaleza empírica de los campos de fuerza, que deben ser correctamente parametrizados, hace que el tratamiento de cualquier efecto electrónico sea inviable. En este sentido, los Campos de Fuerza más utilizados son MM2 (o sus posteriores versiones MM3 y MM4) para moléculas pequeñas (10), Amber (11) para las proteínas (mejor opción, puesto que contempla las interacciones electrostáticas de una forma más adecuada) o CHARMM (12).

Finalmente, los métodos híbridos de QM-MM tratan la parte reactiva de los sistemas biocatalíticos, relativamente pequeña, a nivel de QM y todo lo demás por MM, ofreciendo una buena alternativa de cálculo. En este sentido, en la Figura 2 se representa los resultados obtenidos en el *docking* de los conformeros de mínima energía del *S*-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa de *C. rugosa*, enantiómero preferentemente reconocido en la hidrólisis estereoselectiva a partir de la mezcla racémica (13).

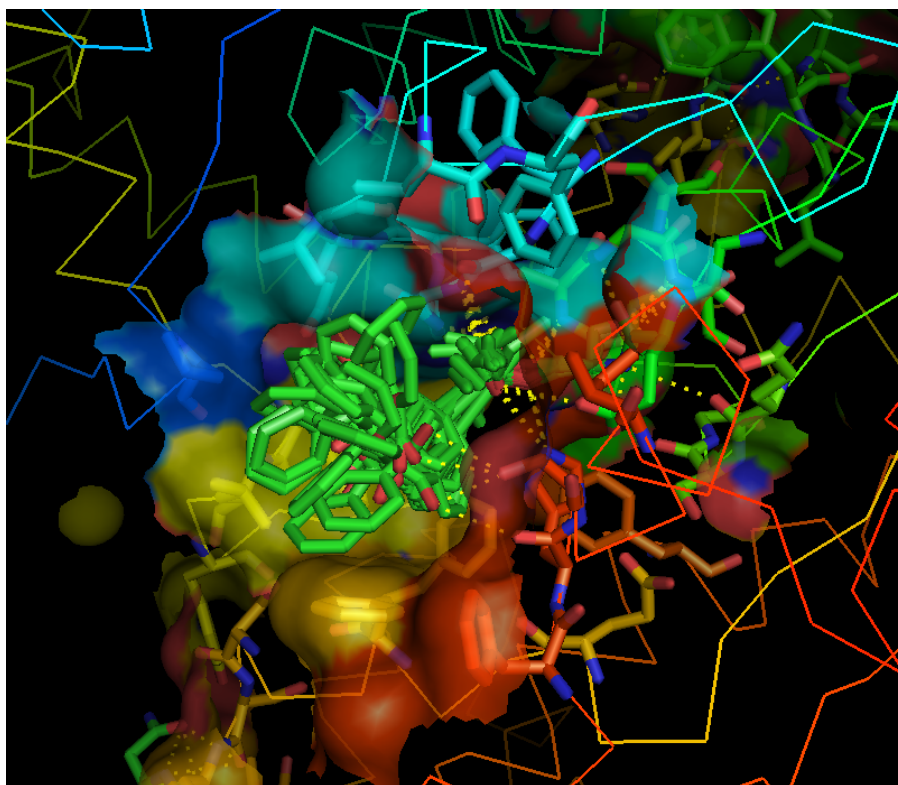


Figura 2.- Confórmeros de mínima energía del S-ketoprofeno en el centro activo de la lipasa de *C.rugosa* (13).

## 2.2. Simulación de análogos del estado de transición

La cinética de las reacciones biocatalizadas, depende de la energía libre de sus estados de transición, en los cuales las especies químicas no son estables. Sin embargo, los métodos de MM solo pueden usarse cuando las estructuras son estables y además son incapaces de simular los procesos de ruptura y formación de enlaces. Así, la estrategia más común para modelar *in silico* las interacciones entre las enzimas hidrolíticas (las más empleadas en Biotransformaciones (14) y sus sustratos, a nivel de MM, es la simulación del intermedio tetraédrico, que es una especie química estable donde un donador de acilo se encuentra unido covalentemente al residuo catalítico de la proteína, y que mimetiza el estado de transición de la reacción (15). Un ejemplo típico, consiste en emplear fosfonatos como análogos del estado de transición en la hidrólisis de ésteres (16). No obstante, el problema radica en que estos análogos únicamente se aproximan al verdadero estado de transición (7). Para intentar solventar este problema, los métodos mixtos QM-MM suelen emplear, en primer lugar, QM para modelar el estado de transición en fase gaseosa, y posteriormente este modelo se traslada al interior de la enzima, realizando el

resto de cálculos mediante MM (17). No obstante, hoy día, con los avances en la capacidad de cálculo de los ordenadores actuales, es posible utilizar QM para el cálculo de los estados de transición no en fase gaseosa, sino directamente en el centro activo (18). Con esta opción, la distribución de las cargas parciales cambia significativamente, de manera que los cálculos posteriores permiten una descripción más adecuada de los resultados experimentales.

### **2.3. Descripción grid de la naturaleza química del centro activo**

La descripción GRID de la capacidad de unión del centro activo, proporciona una información valiosa que complementa la simulación de análogos del estado de transición anteriormente mencionada. El GRID, es un protocolo computacional para detectar sitios de unión energéticamente favorables entre moléculas de estructura tridimensional conocida, desarrollado por Goodford en 1985 (19), en función de la estimación de las energías de interacción entre grupos químicos pequeños (llamados sondas) y una zona determinada de la enzima, generalmente el centro activo. El enfoque GRID, permite una descripción más precisa de la interacción enzima-sustrato y fue aplicado por Gardossi y *co/s.* (20), en el estudio de la selectividad de la penicilina G amidasa (PGA). Además de proporcionar directrices para el acoplamiento de los sustratos en el centro activo de la enzima, la visualización de los campos de interacción molecular (MIF) generados por diferentes sondas (hidrofóbicas, donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno y grupos cargados), permitió una exploración fácil y rápida de la naturaleza química del centro activo, consiguiendo así un esquema completo de los requerimientos estructurales del sustrato para su reconocimiento óptimo. Además, el estudio estableció las normas generales para la enantiodiscriminación, ilustrando cómo los enantiómeros tienen diferentes interacciones con dos zonas químicamente distintas del centro activo (20b). Las velocidades de acilación determinadas experimentalmente, fueron posteriormente utilizadas para validar el modelo, el cual proporciona sólo una predicción cualitativa del reconocimiento diferencial de los enantiómeros. No obstante, este modelo se aplicó posteriormente para un estudio de optimización en la resolución enzimática a partir de una mezcla de multicomponentes de sustratos en un proceso Diels-Alder, permitiendo

desarrollar una estrategia de ingeniería del sustrato y la predicción de los sustituyentes en el anillo de ciclohexeno que conduce a la más alta enantiodiscriminación ( $E > 200$ ) (21).

Aunque en los ejemplos expuestos hasta ahora se alcanzaron buenos resultados en la racionalización de las estrategias experimentales, todos fallan en hacer una predicción cuantitativa de la selectividad de la enzima, incluso cuando el análisis GRID se combina con aproximaciones al análogo al estado de transición. Esta limitación, se debe a que todos los enfoques descritos se basan en varias aproximaciones significativas (7); así, el primer problema se puede atribuir a la naturaleza simplificada de los cálculos del campo de fuerza empleado. Por otra parte, el segundo gran problema viene del hecho de que las pequeñas diferencias de energía originan grandes variaciones en la selectividad, que pueden ser enmascaradas por las grandes fluctuaciones causadas por el movimiento normal de las proteínas. Esta cuestión, ha sido contemplada en los estudios de Hult *y cols.* (22) al intentar explicar la enantioselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica*.

Otro tipo de limitaciones en la aproximación al análogo al estado de transición, se derivan de la dificultad de evaluar la contribución entrópica a la energía libre de las reacciones. Se ha demostrado, que la entropía puede tener un papel principal en la selectividad de la enzima, en particular cuando los intermedios tetraédricos de los dos enantiómeros difieren en rigidez estructural y en el tipo de interacción con el disolvente, aunque la relación de compensación de los mecanismos entropía-entalpía no ha sido completamente aclarada (23).

#### **2.4. Predicción de la enantioselectividad de la enzima por métodos de mecánica cuántica y/o mecánica molecular**

Para tener en cuenta todas las contribuciones a la energía libre de las reacciones biocatalizadas, deben emplearse enfoques más sofisticados.

El primer y más clásico estudio sobre la predicción cuantitativa de la diferencia de energía libre entre los dos intermedios tetraédricos (véase el apartado 2.3) de dos enantiómeros fue descrito por Colombo *y cols.* (18a) en la resolución de una mezcla racémica de 1-feniletanol por acilación catalizada por

subtilisina. El enfoque consistió en un modelo con todos los átomos con solvatación explícita completa, energía libre de perturbación (FEP), simulaciones de MD (dinámica molecular) y cargas atómicas derivadas de metodologías de QM y/o MM. Los resultados en ese estudio de 1999, probablemente representan la mejor predicción cuantitativa de la enantioselectividad descrita hasta ahora en la bibliografía, pero a pesar de todo, la tasa de error aún puede considerarse como elevada.

Otros estudios, han utilizado métodos *ab initio* de QM y de dinámica molecular-energía libre de perturbación (MD-FEP), para intentar cuantificar la enantioselectividad de la  $\alpha$ -quimotripsina en procesos de hidrólisis (24). En este enfoque, los cálculos *ab initio* para la parte reactiva del complejo enzima-sustrato se combinaron con el tratamiento clásico de la interacción de la energía libre entre el sistema mecano cuántico y el entorno de mecánica molecular. Este estudio, presenta una descripción detallada de enantio-reconocimiento enzimático, así como del efecto de solvatación en la catálisis enzimática, pero sólo a nivel cualitativo.

Sin duda, la principal dificultad a la hora de llevar a cabo una predicción cuantitativa adecuada de la enantioselectividad deriva del hecho de que, aunque se pueda establecer de una forma muy precisa cual es la energía libre del estado de transición del enantiómero preferentemente reconocido dentro del centro activo (ver apartado 2), el otro enantiómero puede tener diferentes tipos de orientaciones, que implican interacciones distintas con diferentes zonas del centro activo (7,25).

## **2.5. Correlación entre la selectividad de la enzima y descriptores moleculares**

Dado que el cálculo preciso de la energía libre de una reacción biocatalizada sigue siendo una tarea difícil, el desarrollo de las alternativas más simples y directas es hoy en día un área activa de investigación. Cabe señalar, que para que una herramienta de predicción sea atractiva, debe ser competitiva con el tiempo empleado en el laboratorio para realizar un experimento. En general, no hay motivos para esperar dos meses para la predicción de una medida que puede ser realizada experimentalmente en dos semanas (9).

En este sentido, los métodos de MD, FEP, y QM no son probablemente los más apropiados para el desarrollo de modelos de predicción, al menos a la luz de los instrumentos de cálculo comúnmente disponibles. Como consecuencia, se han desarrollado varias estrategias alternativas encaminadas a simplificar cálculos y evitar el cálculo de la energía del estado de transición de la reacción.

Estas ideas se han aplicado en el estudio de enantio-reconocimiento de alcoholes terciarios por carboxilesterasas (26), demostrando cómo una predicción cuantitativa de la enantioselectividad se puede realizar evitando el cálculo de la energía libre del estado de transición. En este sentido, el análisis geométrico de los intermedios tetraédricos, construido por *docking* manual y simulaciones de MD, puso de manifiesto la correlación cuantitativa entre la enantioselectividad y un descriptor geométrico único, definida como la distancia entre el nitrógeno de la histidina catalítica y uno de los átomos de oxígeno del sustrato. Aunque la validez de este tipo de descriptores no se puede asumir como general, la identificación de correlaciones similares en diferentes sistemas biocatalíticos representa una ruta original y sencilla para la predicción de la enantioselectividad en un plazo razonable de tiempo.

Como ejemplo realizado en nuestro grupo de investigación, comentaremos el estudio que se ha realizado para explicar la regio y estereoselectividad encontrada en la acilación de diferentes (1,*n*)-alcanodiolos empleando la lipasa de páncreas porcino (27); mediante la realización de un *docking* manual de los diferentes sustratos en la estructura descrita del centro activo, ilustrado en la Figura 3 para el 2-fenil-1,3-propanodiol, donde se postuló como importante el posible papel del residuo Phe216 para el correcto reconocimiento del sustrato, ajustando las dimensiones de los sustratos a un triángulo cuyas dimensiones coinciden con los residuos Ser153, His264 (correspondientes a la tríada catalítica) y la mencionada Phe216.

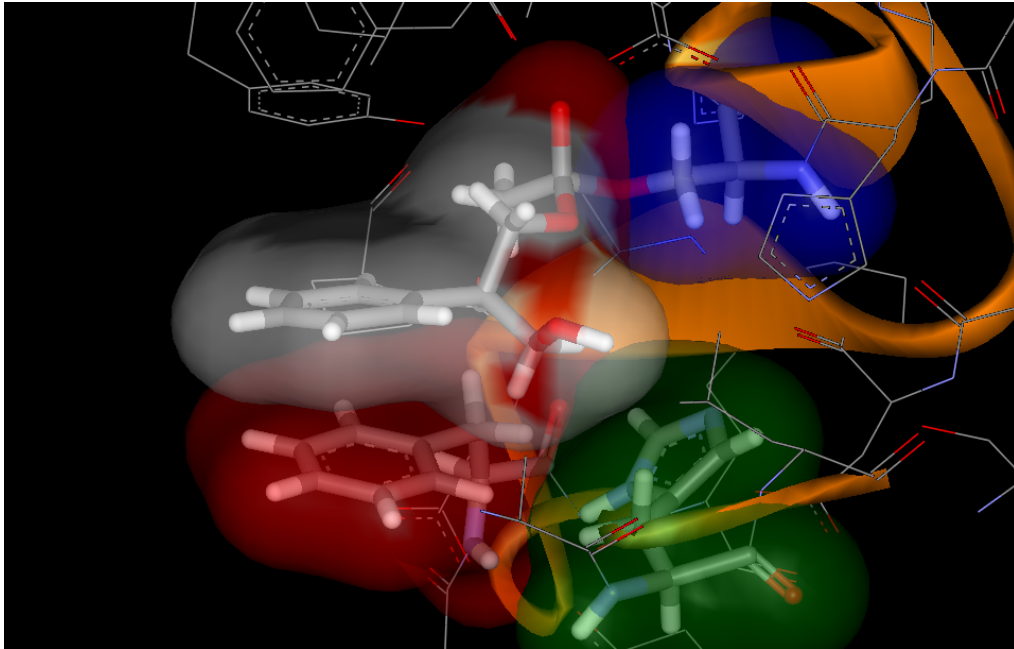


Figura 3.- *Docking* manual del 2-fenil-1,3-propanodiol (gris) en el centro activo de la lipasa de páncreas porcino (PPL) (27), con simulación del estado de transición. Residuos implicados: Ser 153 (azul), His264 (verde) y Phe 216 (rojo).

Un estudio más refinado de *docking* (13) ha confirmado dicha hipótesis, al confirmarse las distancias previstas y las interacciones propuestas (Figura 4).

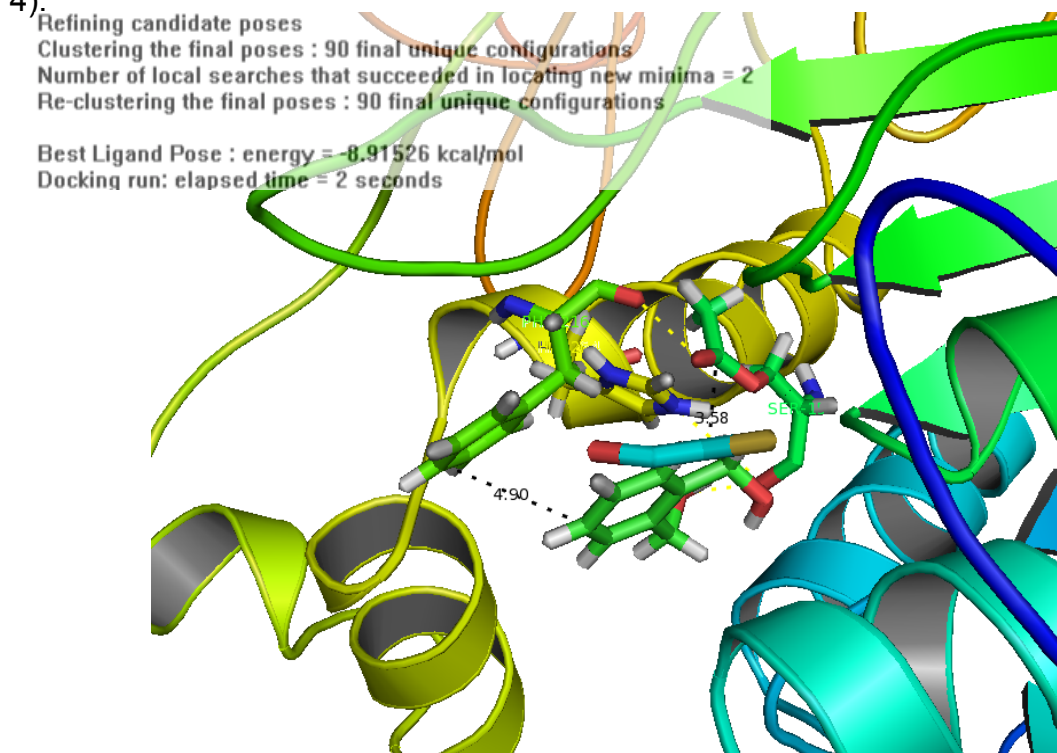


Figura 4.- *Docking* automático del 1-fenil-1,2-etanodiol en el centro activo de la lipasa de páncreas porcino (PPL) (13), realizado con el Software ArgusLab.



## 2.6. Estudio del efecto de los disolventes

Como se mencionó anteriormente, es muy importante considerar que, puesto que el Modelado Molecular debe intentar interpretar y predecir resultados experimentales, los procesos biocatalíticos se llevan a cabo en presencia de disolventes, por lo que el efecto de la solvatación debe ser estudiado.

Inicialmente, la mayoría los cálculos de modelado incluyen las moléculas de agua que se encuentran en la estructura de cristal, pero no las moléculas de agua adicionales del disolvente, cuyo efecto generalmente se simula utilizando un parámetro dieléctrico dependiente para intentar imitar la solvatación (7). Ke y *co/s.*(28), utilizaron un método mejorado para simular el agua disolvente, un modelo electrostático continuo, pero los resultados fueron similares a los obtenidos del modelo más simple. Este tratamiento incompleto de solvatación es claramente una aproximación. Está claro que el disolvente puede cambiar la selectividad de la enzima, aunque existe aún desacuerdo sobre por qué esto ocurre.

Una de las posibles explicaciones propuesta, atribuye la capacidad de estereodiscriminación a la diferente solvatación de los complejos diastereoisoméricos enzima-sustrato. En este sentido, Ke y Klibanov (29) estudiaron la enantioselectividad de la quimotripsina en la acilación de un diol proquiral, encontrando que el estado de transición que conducía hacia la acilación en el hidroxilo *pro-R* colocaba un resto de 3,5-dimetoxifenilo en un bolsillo de la enzima, mientras que el estado de transición conducente a la acilación en el hidroxilo *pro-S* dejaba este resto arilo expuesto hacia el disolvente. La propuesta de estos autores correlacionaba la enantioselectividad observada con los coeficientes de actividad termodinámica de la zona aromática expuesta, no como una predicción cuantitativa, sino como una correlación directa en el sentido de mejor solvatación de las partes expuestas, traduciéndose en una mayor enantioselectividad. Sin embargo, este método no pudo ser extrapolado a otros sustratos.

Para complicar aún más la situación, también debe considerarse que ciertos aminoácidos que no están en contacto directo con el sustrato pueden



influir de manera decisiva en la selectividad, tal y como sucede con el residuo 225 en la trombina, que nunca contacta con el sustrato, pero ejerce su influencia en la forma y disposición del canal de agua que se localiza en la proximidad del centro activo (30).

La capacidad de ciertas enzimas para trabajar de manera eficiente en medios no acuosos es ampliamente conocida. Entre estos medios, no convencionales podemos considerar disolventes orgánicos (8,31), líquidos iónicos (32) o fluidos supercríticos (33). En este sentido, las lipasas son enzimas especialmente interesantes (34), dado su excepcional actividad en disolventes orgánicos, por lo que el estudio mediante Modelado Molecular de su comportamiento en dichos medios constituye un campo de trabajo muy habitual. Especialmente estudiado ha sido el movimiento de la tapadera, hélice  $\alpha$  de carácter anfipático próxima al centro activo; cuando la enzima está en conformación cerrada dicha tapadera cubre completamente el centro activo, mientras que cuando se activa la enzima, en un proceso denominado activación superficial, dicha tapadera se mueve, por lo que deja expuesto el centro activo al sustrato (35), por lo que su influencia en la actividad catalítica es considerable (36). La conformación cerrada predomina en medio acuoso, mientras que en medio orgánico o en presencia de interfase agua/lípido, prevalece la conformación abierta. Existen muchos trabajos que han abordado el estudio del movimiento de la tapadera mediante técnicas de Dinámica Molecular (MD), con el objetivo de comprender los cambios conformacionales asociados a dicho movimiento, y las posibles influencias sobre el mismo (disolvente, pH, temperatura, etc.) (37). No obstante, la mayoría de ellos han abordado el estudio centrándose en las propiedades dinámicas de los dos estados del equilibrio (lipasa cerrada y lipasa abierta), usando simulaciones de MD a corto tiempo (<10ns) para intentar encontrar cuáles son los principales átomos y residuos involucrados en el movimiento. En este sentido, Guieysse y cols., siguiendo unos estudios previos (38) han estudiado muy recientemente (39) de forma exhaustiva el movimiento de la tapadera de la lipasa de *Burkholderia cepacia*, tanto en medio acuoso como en tolueno. De acuerdo con sus observaciones, basadas en simulaciones de MD a largos tiempos, estos autores describen importantes modificaciones conformacionales en la enzima,

que efectivamente expone o protege su centro activo frente al sustrato dependiendo del entorno disolvente (agua, octano, interfaz de agua/octano). Así, la interconversión de la conformación abierta hasta la cerrada en agua, y de ésta última hasta la primera en octano se observa espontáneamente en simulaciones de MD de 20 ns, lo que indica que las barreras de energía entre ambos estados deben reducirse por efecto del disolvente. De manera más precisa, se observa un desplazamiento de aproximadamente 13Å de la tapadera, la cual abarca unos 40 residuos, y que está compuesta por dos hélices  $\alpha$  separadas por un bucle corto.

## **2.7. Modelado molecular e ingeniería racional de enzimas**

Algunos de los logros más relevantes de las técnicas computacionales en Biocatálisis provienen de la Ingeniería Racional de enzimas, entendiendo por este término la mutación selectiva de algunos aminoácidos en la estructura de la proteína para lograr un efecto determinado (aumento de actividad, estereoselectividad, estabilidad, etc.) (40).

Como ejemplo clásico de esta metodología, citaremos el trabajo de Scheib y *cols.* (41), en el cual el Modelado Molecular pudo predecir que la sustitución del residuo Leu258 en la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL) por una fenilalanina, permitiría el (finalmente comprobado experimentalmente) aumento en la enantioselectividad en la hidrólisis de triglicéridos. En otro ejemplo, el Modelado Molecular permitió predecir la mutagénesis de 3 aminoácidos en la apolipoproteína C-III (apoC-III) y así alterar la unión de la misma a diferentes lípidos (42) o a la lipoproteína lipasa (LPL) (43). Por su parte, Botta y *cols* (44) utilizaron técnicas de Modelado Molecular para estudiar la importancia de los residuos Phe344 y Phe345 sobre el reconocimiento del éster metílico del Ketoprofeno en su hidrólisis enantioselectiva por parte de la lipasa de *Candida rugosa*. Por último, citaremos el estudio publicado por los grupos de Jaeger y Thiel (45), en el cual se utilizaron técnicas de Modelado simulando la estrategia del escaneo de alanina (“Ala-scan”, consistente en la sustitución sistemática de una serie de aminoácidos por alanina, de manera que por la variación observada en una determinada propiedad en el mutante se puede deducir la mayor o menor importancia del aminoácido sustituido), que apuntaban a la importancia vital del residuo His76 en la actividad de la lipasa de *Bacillus*

*subtilis*. Posteriormente, al construir la biblioteca de mutantes, este hecho quedó plenamente confirmado. Asimismo, comentar que en el estudio del movimiento de apertura de la tapadera de la lipasa de *Burkholderia cepacia* mencionado en el apartado anterior (39), la mutación *in silico* de dos aminoácidos presentes en dicha tapadera (Val138 y Phe142), inicialmente expuestos al disolvente y que terminan enterrados hacia el interior cuando la lipasa se cierra, permite comprobar su papel clave en el equilibrio entre conformaciones, de manera que la mutación de Val138 hasta Ala o Ser impide por completo el cierre de la tapadera y el cambio de la Phe142 por serina hace que la lipasa adopte una conformación intermedia entre abierta y cerrada.

No obstante, esta aproximación a la evolución del biocatalizador es a veces vista como competencia con la metodología de Evolución Dirigida (46). Evidentemente, aunque el modelado molecular es muy adecuado para optimizar tanto las posibles interacciones enzima-sustrato como para dilucidar el mecanismo catalítico de la enzima, hemos de reconocer que en general es mucho menos eficiente para la identificación de los efectos de las mutaciones que se encuentran alejadas del centro activo, que pueden alterar la estructura de la proteína y modificar su comportamiento (47). En este contexto, la Evolución Dirigida puede ofrecer una solución más eficiente al problema.

Por otro lado, el Modelado Molecular también puede ser empleado para racionalizar las bases de la “promiscuidad” de las enzimas (48), entendiendo por tal concepto, según Hult y Berglund (48d), bien la capacidad de algunas de ellas de trabajar en condiciones experimentales diferentes de las que les son naturales (medios no acuosos, valores extremos de temperatura y/o pH, ...), bien la capacidad de reconocer un amplio abanico de sustratos de diferente estructura, o bien su capacidad para catalizar diferentes reacciones químicas con diferentes estados de transición. Estos mismos autores, definen a estas tres habilidades como promiscuidad de condición, de sustrato o catalítica, respectivamente. Así, por ejemplo, Branney y cols (49), mediante el empleo de técnicas de Modelado Molecular (cálculos de mecánica cuántica sobre análogos del estado de transición, ver apartado 2) fueron capaces de explicar de manera eficiente la razón por la cual la mutación Ser105Ala en la lipasa B de *Candida antarctica* convierte esta enzima desde una hidrolasa hasta una

aldolasa, siendo capaz de catalizar la condensación aldólica entre aldehídos. Esa misma mutación, anticipada por cálculos mecano cuánticos, estudios de *docking* y simulaciones de mecánica molecular, permite a esa misma lipasa catalizar adiciones conjugadas de tioles y aminas a compuestos carbonílicos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados (50). Estos dos ejemplos, ilustran perfectamente los tres tipos de promiscuidad: una lipasa funcionando en procesos que no son los naturalmente habituales (promiscuidad catalítica), actuando sobre aldehídos o aminas y tioles (promiscuidad de sustrato), y en disolventes orgánicos (promiscuidad de condición).

### **2.8. Modelado molecular combinado con quimiometría: qsar 3d para la predicción de la enantioselectividad**

Los métodos QSAR 3D (relaciones cuantitativas estructura-actividad en tres dimensiones) utilizan los datos provenientes de simulaciones moleculares como entrada para el análisis estadístico multivariante y representan la fusión entre el Modelado Molecular y la Quimiometría. Aunque el uso de QSAR 3D está bien establecido en el diseño de fármacos, la aplicación de estos métodos en Biocatálisis se ha llevado a cabo no hace muchos años. Los trabajos pioneros de Tomić y cols (51), representan un ejemplo de como las predicciones cuantitativas de  $k_{cat}/K_M$  son viables a través de un enfoque QSAR 3D, que correlaciona los descriptores sistema químico con los datos experimentalmente medibles. La predicción cuantitativa de la enantioselectividad de la lipasa de *Bulkholderia cepacia*, se logró mediante el desarrollo de un método en el que la energía libre de unión se calcula de manera aproximada a través de una combinación lineal de la energía de interacción del complejo enzima-sustrato y la superficie polar y no polar accesible al disolvente. El peso de cada parámetro se calculó por análisis PLS, y el alto coeficiente de correlación de predicción ( $Q^2= 0,84$ ) confirma la validez de la aproximación (51b). Posteriormente, estos autores disminuyeron el tiempo de cálculo adoptando el método Monte Carlo de análisis conformacional, de manera que lograron unos buenos resultados en la predicción cuantitativa de los valores de enantioselectividad de una nueva serie de sustratos (51c).

Por otra parte, la aplicación de la técnica de QSAR 3D para la predicción cuantitativa de la selectividad enzimática de la Penicilin G-Acilasa, empleando dos métodos QSAR derivados de GRID (GRIND (52) y Volsurf (53)), ha sido descrita por Braiuca y cols (54). Los valores medidos experimentalmente de  $k_{cat}/K_M$  fueron utilizados como variable respuesta para la construcción de un modelo de regresión múltiple, basado en descriptores moleculares puramente geométricos calculados por el método de GRIND y Volsurf. La gran ventaja de esta aproximación es que, una vez que se dispone de un conjunto de datos experimentales, se puede construir un modelo completo de predicción en unas pocas horas. Muy recientemente, estos mismos autores (55) han descrito el uso de la metodología de QSAR 3D para diseñar un modelo predictivo que describe la enantioselectividad de la lipasa B de *Candida antarctica* en la resolución de alcoholes y aminas quirales. En este caso, el descriptor molecular utilizado, también basado en GRID, denominado DIMFs (acrónimo en inglés de *Campos Diferenciales de Interacción Molecular*), ha permitido la creación de un modelo predictivo fiable y robusto.

En otro orden de cosas, el QSAR 3D también puede emplearse en Biocatálisis en sistemas en los cuales no se conoce la estructura tridimensional del biocatalizador, mediante el empleo de estudios CoMFA (acrónimo de Comparative Molecular Field Analysis (56)); aplicando esta metodología, se pudo predecir la estructura del sustrato modelo en la biorreducción de diferentes cetonas empleando células enteras de *G. candidum* y *S. octosporus*, representados en la Figura 5 (57). El código de colores es el que sigue: i) *Zonas de bajo impedimento estérico* (verde). Son zonas donde la presencia de restos químicos del sustrato favorece la interacción enzima-sustrato. ii) *Zonas de alto impedimento estérico* (amarillo). Son zonas donde la presencia de grupos en el sustrato disminuye la afinidad de la ADH por el sustrato. iii) *Zonas electrostáticas*: rojas, donde una elevada densidad electrónica favorece la interacción y azules donde una elevada densidad de carga negativa desfavorece la interacción. La principal ventaja de esta metodología para modelar el centro activo de una enzima desconocida es que estamos ante un método puramente químico que permite predecir, sin conocer la estructura primaria de la enzima y sin siquiera haberla aislado.

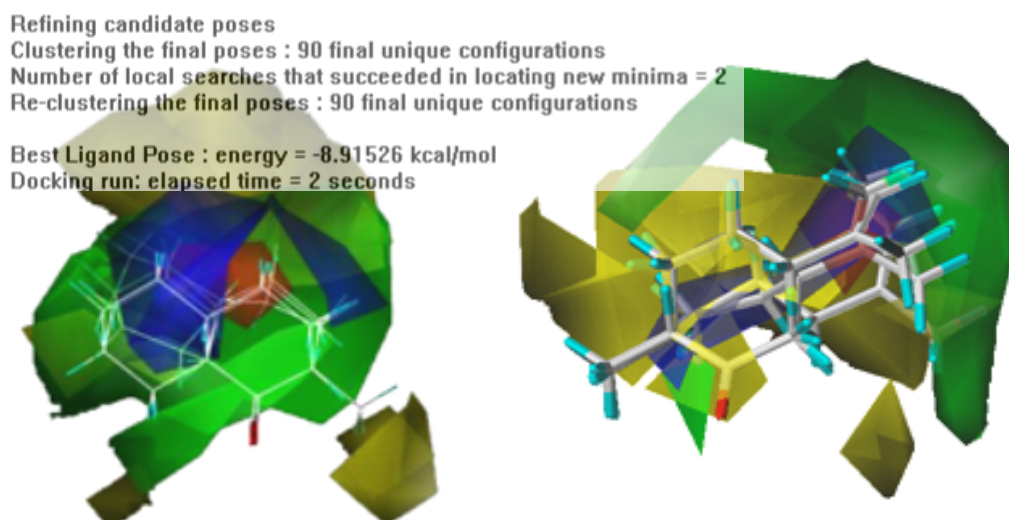


Figura 5.- Metodología QSAR-3D/ CoMFA para la predicción de los requerimientos de diferentes sustratos para ser reducidos empleando células de *G. candidum* (izquierda) y *S. octosporus* (derecha). Ver código de colores en el texto.

### 3. NIVELES 2,3 Y 4

Los modelos de reacción, reactor y proceso tienen como objetivo común la optimización, diseño o análisis, y por tanto resultan herramientas muy útiles para los ingenieros a la hora de desarrollar, definir y ampliar la aplicabilidad de nuevos bioprocesos. Mientras que los modelos para el biocatalizador tienen que ver con la naturaleza de la enzima, los modelos de reacción y el reactor (niveles 2 y 3) son en su mayoría cinéticos, y se basan en la descripción de la velocidad observada en el proceso biocatalítico, generalmente obtenidos a partir de la velocidad inicial medida en diferentes experimentos variando tanto la concentración de enzima como de sustrato. Por su parte, los modelos de proceso (nivel 4), utilizan el modelado de reactor para describir las diferentes unidades operacionales involucradas en la reacción (biorreactores y/o fermentadores, reservorios de sustratos y productos) y posteriormente unir estos modelos así contruidos con otros submodelos que describan otras unidades de proceso también involucrados en el esquema de flujo, tales como cristalizadores y separadores, por ejemplo. Los modelos integrados de procesos, en última instancia, tienen por objeto evaluar la interacción entre las diferentes unidades de proceso para estimar de forma realista los parámetros de respuesta deseados, generalmente el rendimiento global del producto (5a).

Además, en algunos casos, puede resultar ventajoso combinar las operaciones de la unidad en las llamadas operaciones híbridas para mejorar, por ejemplo, *in situ* la eliminación del producto (58). En estos casos, un análisis de costo-beneficio debe llevarse a cabo, ya que bajo ciertas condiciones algunos índices métricos pueden ser mejorados, pero generalmente a expensas de otros, por lo que la evaluación de los pros y contras juegan un papel muy importante para el modelado óptimo del proceso.

A la hora de presentar de forma sistemática algunos ejemplos, utilizaremos los siguientes criterios:

- el propósito del modelo,
- el proceso que se ha modelado y las unidades que se han tenido en cuenta (bien todo el proceso, bien solo una unidad),
- la estructura del modelo (cinética), y
- el procedimiento de identificación del modelo (por ejemplo, los datos experimentales, la estimación de parámetros, la estimación del error de dichos parámetros (intervalo de confianza), y la incertidumbre en las predicciones del modelo).

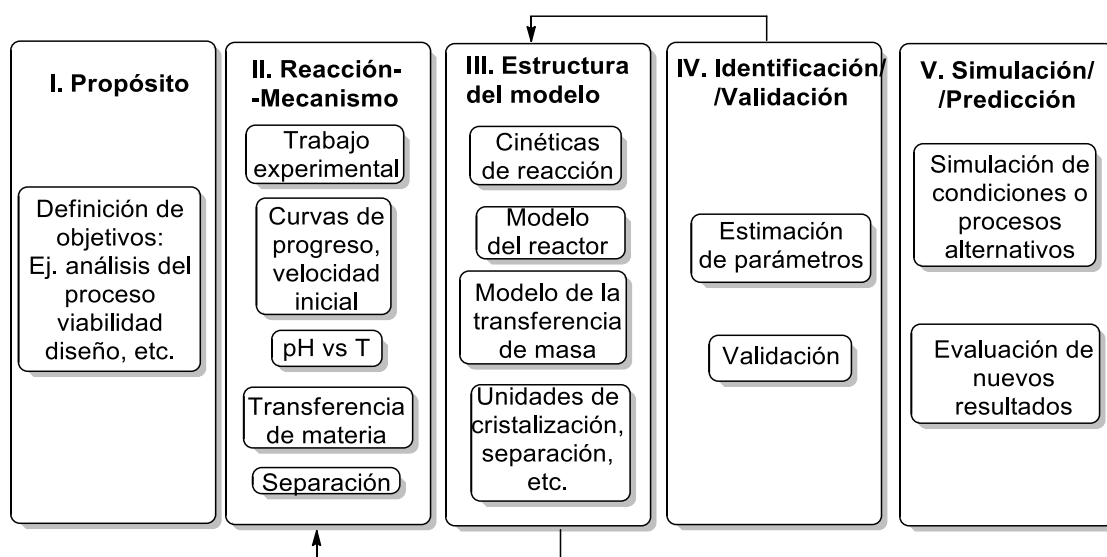


Figura 6.- Pasos típicos seguidos en un modelado: las flechas indican retroalimentación, donde se producen iteraciones. Adaptado de Sin y cols (5a).



Por lo que respecta al procedimiento general seguido durante la construcción del modelo, éste consiste básicamente en un proceso en 5 etapas, tal y como se indica en la Figura 6.

Es interesante señalar, que la mayoría de los modelos están contruidos teniendo en mente un objetivo determinado (aunque a veces el propósito del estudio de modelado es más implícito que explícito). Después de haber especificado el objetivo (Paso 1), el estudio por lo general pasa a caracterizar el mecanismo de la reacción y otras unidades relevantes del proceso, por ejemplo la transferencia de masa o separación/extracción del producto (Paso 2). En este paso, el objetivo del modelado determina realmente el alcance y la dirección experimental de la investigación requerida, por ejemplo, si se tiene en cuenta el pH o no, o si es preciso revisar los efectos de la temperatura. Después de haber recogido los datos experimentales relevantes para la elucidación del mecanismo de reacción, el Paso 3 formula la estructura del modelo que puede implicar la definición de la cinética de reacción así como otras características de proceso tales como el modelo de reactor empleado, el tipo de mezcla (mezcla ideal vs modelos hidrodinámicos 2D o 3D), de transferencia de masa, modelo de separación, etc. En el Paso 4, se estiman los parámetros del modelo a partir de datos experimentales y/o adaptados de la literatura más relevante. Es importante mencionar, que en este paso la estimación de parámetros debería ser complementada con estudios de validación adecuados para determinar una cierta fiabilidad del modelo, fiabilidad que se debe vincular a la finalidad del estudio. Por último, en el Paso 5 el modelo se utiliza para el propósito para el que ha sido construido, por ejemplo, para simular las condiciones alternativas o procesos de regímenes de flujo. En general, se piensa que, siguiendo un procedimiento normalizado y sistemático durante la construcción del modelo (como el que se presenta en la Figura 6) se logran ciertas ventajas, puesto que se contribuye a una mayor transparencia del proceso de construcción del modelo, y se ayuda a modificar la construcción de modelos a partir de una base *ad hoc* a un método más basado en el modo general. Por último, los procedimientos estandarizados pueden facilitar la evaluación del modelo resultante y promover la transferencia de conocimiento con respecto al modelo de estudio y sus resultados entre



pares en el campo de la Biocatálisis. Para ello, sería altamente recomendable que los investigadores que trabajan en modelado desarrollen de común acuerdo directrices de modelado.

A modo de ejemplo, citaremos algunos casos recogidos en la bibliografía de lo que corresponde a modelados globales de procesos biocatalíticos, y que aparecen reflejados en la Tabla II.

Si consideramos los objetivos que se persiguen en el modelado (Paso 1), podremos distinguir los siguientes casos a partir de los ejemplos indicados en dicha Tabla II:

- Análisis cinéticos, en los cuales el modelo (construido basándose en el mecanismo de la reacción, p.e., mecanismos ping-pong bi-bi) se usa para identificar la velocidad de reacción y la cinética del proceso.
- Análisis del proceso, en los cuales se emplea un modelo validado para la evaluación continua de diferentes parámetros y configuraciones, y de esta forma simular todo el proceso, en un modelo netamente predictivo, y;
- Diseño; en este caso, el modelo se emplea para dimensionar las unidades implicadas en el proceso, para llegar a un rendimiento final deseado y así poder evaluar la viabilidad económica global.

Como puede observarse en la Tabla II, la mayoría de los modelos desarrollados se centran en el objetivo 1, el análisis cinético., lo que no deja de ser necesario como un primer paso para entender el mecanismo intrínseco, la velocidad y las limitaciones inherentes al proceso (inhibición, limitaciones difusionales, etc). En este sentido, Paiva y *cols* (59) realizaron un estudio detallado de las cinéticas y los mecanismos de Bioprocesos catalizados por lipasas, concluyendo que los datos cinéticos y los termodinámicos no pueden considerarse de una manera aislada sino integrada.

Tabla II.- Ejemplos de Modelos de reacción, reactor y proceso aplicados a biotransformaciones.

Propósito	Proceso	Estructura del modelo	Identificación del modelo			
			Parámetros	Variables	datos	Ref.
<b>Análisis cinético</b>	Hidrólisis de adipil-7-ADCA hasta 7-ADCA usando glutaril acilasa inmovilizada	Modelo termodinámico basado en cálculo de rendimientos y constantes de equilibrio. Cinéticas reversibles de reacción en dos pasos, con correcciones de temperatura tipo Arrhenius	7	3	14 equilibrios 3 velocidades de reacción 12 experimentos a distintas temperaturas	Schroën y cols <sup>60</sup>
<b>Análisis cinético</b>	Síntesis de cefalexina usando fenilglicinamida y 7 ADCA catalizada por Assemblase® (Penicilinacilasa inmovilizada)	Cinéticas reversibles de reacción en dos pasos, con correcciones de temperatura tipo Arrhenius	10	¿?	15 experimentos de síntesis e hidrólisis	Schroën y cols <sup>61</sup>
<b>Análisis cinético</b>	Biotransformación de benzaldehído en (R)-mandelonitrilo catalizada por hidroxinitriloliasa de <i>Prunus amygdalus</i> .	Modelo cinético tipo bi-uni reversible considerando la transferencia de materia entre fase acuosa y fase orgánica, así como balances de materia	10	6	11 curvas de progreso y experimentos de transferencia de materia. 11 experimentos de validación	Willemán y cols <sup>62</sup>
<b>Análisis cinético</b>	Acilación de glucosa con ácido láurico en 2-metil-2-butanoil catalizada por lipasa de <i>Candida antarctica</i> .	Modelo cinético reversible simplificado tipo ping-pong bi-bi.	3	4	3 velocidades iniciales 1 curva de progreso 1 experimento de equilibrio	Flores y cols <sup>63</sup>
<b>Análisis cinético</b>	Transformación de pseudocumol en dimetilbenzaldehído catalizada por células enteras recombinantes de <i>E.coli</i> con actividad xilenomonooxigenasa	Cinéticas de bioconversión, crecimiento celular, transferencia de materia, balances de materia entre las fases acuosas y orgánicas	23	7	4 reactores tipo fed-batch de 2L y de 30L.	Bühler y cols <sup>64</sup>

<b>Análisis cinético</b>	Esterificación de ácido propiónico con 1-butanol en un sistema bifásico agua/ <i>n</i> -decano catalizada por lipasa B de <i>Candida antarctica</i> .	Mecanismo ping-pong bi-bi con inhibición competitiva del alcohol	4	3	Experimentos de velocidad inicial de reacción en reactores a escala de laboratorio	Swarts y cols <sup>65</sup>
<b>Análisis cinético</b>	Resolución cinética de 1-metoxi-2-propanol por transesterificación con acetato de etilo catalizada por lipasa	Mecanismo extendido tipo ping-pong bi-bi reversible con inhibición (tipo Haldane) acoplado a un modelo de difusión	11	6	6 velocidades iniciales 1 experimento para determinar el exceso enantiomérico	Berendsen y cols <sup>66</sup>
<b>Análisis del proceso</b>	Hidrólisis enzimática de adipil-7-ADCA usando glutaril acilasa inmovilizada	Modelo de Schroën y cols <sup>60</sup> extendido con velocidad de pseudo-primer orden para la degradación del producto	10	3	1 experimento de validación	Schroën y cols <sup>67</sup>
<b>Análisis del proceso</b>	Síntesis de ( <i>R</i> )-mandelonitrilo en un sistema bifásico orgánico-acuoso	Modelo de Willeman y cols <sup>62</sup>	10	6	¿?	Willeman y cols <sup>68</sup>
<b>Análisis del proceso</b>	Oxidación tipo Baeyer-Villiger catalizada por células recombinantes de <i>E.coli</i>	Análisis del régimen del proceso usando relaciones lineales con restricciones de desigualdades	3	3	2 experimentos en régimen de planta piloto (50 L)	Law y cols <sup>69</sup>
<b>Análisis del proceso</b>	Resolución cinética de 1-metoxi-2-propanol por transesterificación con acetato de vinilo catalizada por lipasa	Modelos 2D (balances de materia y energía) acoplados a modelos cinéticos y difusionales de Berendsen y cols <sup>66</sup>	11	6	Validación con datos de exceso enantiomérico y de rendimiento del proceso	Berendsen y cols <sup>70</sup>

<b>Análisis del proceso</b>	Creación de enlaces C-C catalizada por transcetolasa usando hidroxipiruvato como donador del sintón cetólico	Mecanismo tipo ping-pong bi-bi con inhibición por exceso de sustrato integrado con variables empíricas del proceso	7	3	Datos bibliográficos	Chen y cols <sup>71</sup>
<b>Diseño del proceso</b>	Isomerización enzimática de glucosa hasta fructosa catalizada por glucosa isomerasa inmovilizada.	Modelo integrado de proceso consistente en balances de materia, velocidades de reacción (Michaelis-Menten reversibles), desactivación enzimática y limitaciones de transferencia de materia, debido a la inmovilización	¿?	¿?	Sin información	Illanes y cols <sup>72</sup>
<b>Diseño del proceso</b>	Oxidación de <i>n</i> -octano a 1-octanol catalizada por células de <i>Pseudomonas oleovorans</i> en un reactor tipo fed-batch y fermentaciones en continuo + recuperación y purificación de los productos	Balances (en estado estacionario) de materia y energía para cada unidad del proceso (19 en total), desde almacenamiento de materiales de partida hasta fermentación, recuperación de productos	Sin información	Sin información	Sin información	Mathys y cols <sup>73</sup>
<b>Diseño del proceso</b>	Producción enzimática de siropes a partir de suero de leche hidrolizado e isomerizado, catalizada por lactasa y glucosa isomerasa inmovilizadas	Modelo de proceso que usa cinéticas enzimáticas con inhibición competitiva, limitaciones despreciables de transferencia de masa, inactivación enzimática y modelo (en estado estacionario) de reactor de lecho empacado.	21	4	¿?	Illanes y cols <sup>74</sup>

Aparte del propósito del análisis cinético, se ha puesto la atención en el desarrollo de modelos para ser usados para el análisis del proceso (objetivo 2). Por ejemplo, los modelos de Berendsen y cols (70) y de Chen y col. (71) han empleado simulaciones de modelo y sugieren que éste puede ser empleado para el diseño del proceso (objetivo 3). Asimismo, los modelos de Illanes y col. (72), Schroën y col. (67) y Willeman y col. (68), usan los de procesos

(obtenidos previamente basándose en datos experimentales), para evaluar las diferentes configuraciones del proceso, así como las limitaciones intrínsecas llevando a cabo simulaciones. Estos estudios, son realmente valiosos, pues demuestran cómo las simulaciones modeladas son útiles para evaluar el comportamiento del proceso si se varía el tipo de reactor o la configuración del mismo.

Por lo que respecta al diseño (objetivo 3), el estudio de Mathys y *col.* (73) se diferencia claramente de los otros, puesto que se centra de manera primaria en el uso del modelo para el diseño detallado del proceso, de manera que puede ser utilizado para una estimación del coste del mismo.

En otro orden de cosas, queda claro a la luz de los datos presentados en la Tabla II que la mayoría de los modelos pueden ser clasificados como mecanísticos, es decir, modelos que se construyen asumiendo un mecanismo de reacción determinado. Cuando el enfoque del modelo es el diseño del reactor, los balances de masa deben ser incluidos para describir o comparar diferentes configuraciones de reactores (batch o fed-batch vs continuo). Por otra parte, las limitaciones de transferencia de masa se consideran sobre todo cuando se construyen modelos para sistemas de enzimas inmovilizadas (74) así como sistemas bifásicos (por ejemplo, entre fase orgánica y acuosa cuando se utilizan disolventes orgánicos en procesos biocatalíticos (62, 64, 75)). Los efectos de mezcla y la hidrodinámica en reactores no se tienen en cuenta tradicionalmente asumiendo condiciones de mezcla ideales (concentración homogénea en todo el reactor), que se describen con el concepto de reactor de tanque agitado continuo (CSTR). El estudio de Berendsen y *col.* (70) por otra parte, basado en una descripción detallada de la mezcla en el reactor por medio de un modelo 2D, se ha revelado muy útil para capturar el perfil del gradiente de sustrato en un reactor de lecho fluidizado. En resumen, la mayoría de los modelos mecanísticos, describen fenómenos que van desde la cinética (velocidad) a la conservación de la energía/masa a las limitaciones de transferencia de masa y mezcla/hidrodinámica. Sin embargo, no se ha convertido en estándar la práctica de considerar todo al mismo tiempo cuando se construyen modelos de procesos. Para finalizar, hemos de considerar que, en comparación con las reacciones catalizadas químicamente, las

reacciones enzimáticas tienen tres características típicas. La primera característica, es la selectividad de la reacción. La mayoría de las reacciones catalizadas químicamente no son selectivas, es decir, se catalizan reacciones similares con diferentes tipos de sustratos o reactivos. Aunque algunas enzimas se han caracterizado por no ser muy selectivas, la gran mayoría servirá para catalizar una sola reacción que implique sólo a ciertos sustratos. Por lo tanto, a diferencia de las reacciones catalizadas químicamente, que precisan usar ecuaciones diferenciales para ser descritas, los modelos cinéticos biocatalíticos pueden normalmente ser expresados por una única ecuación de velocidad. La segunda característica que las distingue es la sensibilidad a las condiciones operativas. Esto significa que, por ejemplo, la dependencia cinética de pH y la temperatura es siempre necesaria y puede dar lugar a parámetros adicionales en la expresión. Por último, la tercera y más importante diferencia es la presencia de sustrato y de inhibición por producto sobre la actividad de la enzima a altas concentraciones. Esto es un elemento vital de las expresiones velocidad de reacción de bioconversión y hace que los modelos cinéticos de reacción enzimática sean más difíciles de determinar, puesto que requieren de la estimación de muchos parámetros en una sola ecuación diferencial. Esto conduce automáticamente a la cuestión de la identificabilidad, es decir si pueden estimarse los parámetros del modelo de forma fiable a partir de las mediciones disponibles. Para una discusión detallada de estos aspectos, que quedaría fuera de los objetivos de la presente revisión, remitimos al lector al excelente trabajo de Sin y col. (5a), en el cual se precisan todos los aspectos que refieren a la identificabilidad de los modelos biocatalíticos, y a la predicción de incertidumbre en los mismos.

#### **4. CONCLUSIÓN Y PROGNOSIS**

La aplicación del modelado matemático en procesos enzimáticos se ha desarrollado de manera considerable a lo largo de los últimos 20 años, y pensamos que su importancia irá en aumento en un futuro no muy lejano. El diseño integrado del proceso biocatalítico, considerando todos los niveles reseñados (Catalizador, Reacción, Reactor y Proceso) y la interacción entre los mismos constituye pues una buena estrategia de abordaje del problema del modelado de una reacción biocatalítica. En este sentido, quizá en el nivel del

catalizador exista una mayor información disponible hoy día; en efecto, el Modelado Molecular constituye una herramienta de gran utilidad para la Biocatálisis aplicada, pues permite interpretar de manera racional el proceso de interacción entre una enzima y su sustrato, y proporciona datos fiables que permiten predecir el comportamiento del sistema.

Sin duda, los grandes avances en el campo de la Bioinformática, asociados al empleo de medios computacionales cada vez más sofisticados, auguran que en poco tiempo nuestra capacidad de extraer conclusiones racionales de los procesos biocatalizados debería aumentar de forma considerable, por lo que, en nuestra modesta opinión, creemos que en los próximos años este área de investigación debería experimentar un considerable aumento en la cantidad de estudios realizados, así como en la calidad de los mismos.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. (a) Meyer, H.-P.; Ghisalba, O.; Leresche, J. E., *Biotransformations and the Pharma Industry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 2010; (b) Rajagopalan, A.; Kroutil, W., Biocatalytic reactions: selected highlights. *Mater. Today* **2011**, *14* (4), 144-152; (c) Nestl, B. M.; Nebel, B. A.; Hauer, B., Recent progress in industrial biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (2), 187-193; (d) Gotor, V.; Flitsch, S., Increasing the diversity of biocatalytic reactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, *15* (2), 185-186.
2. Tao, J.; Xu, J.-H., Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 1-8.
3. (a) Sheldon, R. A.; Arends, I.; Hanefeld, U., *Green Chemistry and Catalysis*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007; (b) Sheldon, R. A.; van Rantwijk, F., Biocatalysis for sustainable organic synthesis. *Aust. J. Chem.* **2004**, *57* (4), 281-289; (c) Sanchez, S.; Demain, A. L., Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. *Organic Process Research & Development* **2011**, *15* (1), 224-230.
4. (a) Tucker, J. L., Green Chemistry: Cresting a Summit toward Sustainability. *Organic Process Research & Development* **2010**, *14* (2), 328-331; (b) Anastas, P.; Eghbali, N., Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 301-312.
5. (a) Sin, G.; Woodley, J. A.; Gernaey, K. V., Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective. *Biotechnol. Progr.*

**2009**, 25 (6), 1529-1538; (b) Tufvesson, P.; Fu, W.; Jensen, J. S.; Woodley, J. M., Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* **2010**, 88 (1), 3-11.

6. Glassey, J.; Gernaey, K. V.; Clemens, C.; Schulz, T. W.; Oliveira, R.; Striedner, G.; Mandenius, C. F., Process analytical technology (PAT) for biopharmaceuticals. *Biotechnology Journal* **2011**, 6 (4), 369-377.

7. Kazlauskas, R. J., Molecular modeling and biocatalysis: explanations, predictions, limitations, and opportunities. *Curr Opin Chem Biol* **2000**, 4 (1), 81-8.

8. Klibanov, A. M., Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **2001**, 409 (6817), 241-246.

9. Braiuca, P.; Ebert, C.; Basso, A.; Linda, P.; Gardossi, L., Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis. *Trends Biotechnol* **2006**, 24 (9), 419-425.

10. Nevins, N.; Allinger, N. L., Molecular mechanics (MM4) vibrational frequency calculations for alkenes and conjugated hydrocarbons. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, 17 (5-6), 730-746.

11. Case, D. A.; Cheatham, T. E.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J., The Amber biomolecular simulation programs. *Journal of Computational Chemistry* **2005**, 26 (16), 1668-1688.

12. Brooks, B. R.; Brucoleri, R. E.; Olafson, B. D.; States, D. J.; Swaminathan, S.; Karplus, M., CHARMM - A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *Journal of Computational Chemistry* **1983**, 4 (2), 187-217.

13. Sanchez-Montero, J. M. In *Modelado molecular como herramienta en el diseño racional de fármacos.*, Mesa Redonda sobre innovación farmacéutica, 2008; Real Academia Nacional de Farmacia: 2009.

14. Bornscheuer, U.; Kazlauskas, R. J., *Hydrolases in Organic Synthesis. Regio- and Stereoselective Biotransformations.* 2<sup>nd</sup> ed.; WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2006.

15. (a) Pleiss, J.; Scheib, H.; Schmid, R. D., The His gap motif in microbial lipases: a determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochimie* **2000**, 82 (11), 1043-52; (b) Mittal, S.; Khanna, S.; Roy, A.; Bharatam, P. V.; Chawla, H. P. S., Candida rugosa lipase mediated multigram synthesis of acid part of S(+)-atliprofen, a new NSAID and molecular modeling studies aimed at predicting selectivity of the enzyme. *Enzyme Microb Tech* **2005**, 36 (2-3), 232-238.

16. (a) Gascoyne, D. G.; Finkbeiner, H. L.; Chan, K. P.; Gordon, J. L.; Stewart, K. R.; Kazlauskas, R. J., Molecular basis for enantioselectivity of lipase from Chromobacterium



viscosum toward the diesters of 2,3-dihydro-3-(4'-hydroxyphenyl)-1,1,3-trimethyl-1H-inden-5-ol. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, *66* (9), 3041-3048; (b) Luic, M.; Stefanic, Z.; Ceilinger, I.; Hodoscek, M.; Janezic, D.; Lenac, T.; Asler, I. L.; Sepac, D.; Tomic, S., Combined X-Ray Diffraction and QM/MM Study of the Burkholderia cepacia Lipase-Catalyzed Secondary Alcohol Esterification. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112* (16), 4876-4883.

17. Zuegg, J.; Honig, H.; Schrag, J. D.; Cygler, M., Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **1997**, *3* (1-4), 83-98.

18. (a) Colombo, G.; Toba, S.; Merz, K. M., Rationalization of the enantioselectivity of subtilisin in DMF. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121* (14), 3486-3493; (b) Otte, N.; Bocola, M.; Thiel, W., Force-Field Parameters for the Simulation of Tetrahedral Intermediates of Serine Hydrolases. *Journal of Computational Chemistry* **2009**, *30* (1), 154-162.

19. Goodford, P. J., A computational-procedure for determining energetically favorable binding-sites on biologically important macromolecules  
*J. Med. Chem.* **1985**, *28* (7), 849-857.

20. (a) Basso, A.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P.; Benedetti, F., GRID/tetrahedral intermediate computational approach to the study of selectivity of penicillin G acylase in amide bond synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics* **2002**, *1601* (1), 85-92; (b) Basso, A.; Braiuca, P.; Clementi, S.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Linda, P., Computational analysis of the aminic subsite of PGA explains the influence of amine structure on enantioselectivity. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *19-20*, 423-430.

21. Strübing, D.; Neumann, H.; Klaus, S.; Jacobi von Wangelin, A.; Gördes, D.; Beller, M.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Gardossi, L.; Kragl, U., Enzymatic resolution of 4-N-phenylacetyl-amino-derivatives obtained from multicomponent reactions using PenG amidase and in silico studies. *Tetrahedron* **2004**, *60* (3), 683-691.

22. Raza, S.; Fransson, L.; Hult, K., Enantioselectivity in Candida antarctica lipase B: a molecular dynamics study. *Protein Sci* **2001**, *10* (2), 329-38.

23. Ottosson, J.; Fransson, L.; Hult, K., Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: an experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science* **2002**, *11* (6), 1462-71.

24. Felluga, F.; Pitacco, G.; Valentin, E.; Coslanich, A.; Fermeiglia, M.; Ferrone, M.; Prich, S., Studying enzyme enantioselectivity using combined ab initio and free energy calculations: [alpha]-chymotrypsin and methyl cis- and trans-5-oxo-2-pentylpiperidine-3-carboxylates. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (21), 3385-3399.

25. (a) Kazlauskas, R., Modeling - A tool for experimentalists. *Science* **2001**, *293* (5538), 2277-+; (b) Park, J.-H.; Ha, H.-J.; Lee, W. K.; Génèreux-Vincent, T.; Kazlauskas, R. J.,

Molecular Basis for the Stereoselective Ammoniolysis of *N*-Alkyl Aziridine-2-Carboxylates Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. *ChemBiochem* **2009**, *10* (13), 2213-2222.

26. Henke, E.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D.; Pleiss, J., A molecular mechanism of enantiorecognition of tertiary alcohols by carboxylesterases. *ChemBiochem* **2003**, *4* (6), 485-493.

27. (a) Borreguero, I.; Sánchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V.; Rumbero, A.; Hermoso, J. A.; Alcántara, A. R., Regioselective resolution of 1,n-diols catalysed by lipases: a rational explanation of the enzymatic selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2001**, *11* (4-6), 1013-1024; (b) Borreguero, I.; Sinisterra, J. V.; Rumbero, A.; Hermoso, J. A.; Martínez-Ripoll, M.; Alcántara, A. R., Acyclic phenylalkanedioles as substrates for the study of enzyme recognition. Regioselective acylation by porcine pancreatic lipase: a structural hypothesis for the enzymatic selectivity. *Tetrahedron* **1999**, *55* (52), 14961-14974.

28. Ke, T.; Tidor, B.; Klivanov, A. M., Molecular-modeling calculations of enzymatic enantioselectivity taking hydration into account. *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, *57* (6), 741-745.

29. Ke, T.; Klivanov, A. M., Insights into the solvent dependence of chymotryptic prochiral selectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (18), 4259-4263.

30. Guinto, E. R.; Caccia, S.; Rose, T.; Futterer, K.; Waksman, G.; Di Cera, E., Unexpected crucial role of residue 225 in serine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1999**, *96* (5), 1852-1857.

31. Adlercreutz, P., Fundamentals of Biocatalysis in Neat Organic Solvents. In *Organic Synthesis with Enzymes in Non-Aqueous Media*, Carrea, G.; Riva, S., Eds. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2008; pp 3-24.

32. Itoh, T.; Tomoko, M., Biotransformation in ionic liquid. In *Future Directions in Biocatalysis*, Elsevier Science B.V.: Amsterdam, 2007; pp 3-20.

33. Matsuda, T.; Harada, T.; Nakamura, K.; Ikariya, T., Asymmetric synthesis using hydrolytic enzymes in supercritical carbon dioxide. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16* (5), 909-915.

34. Reetz, M. T., Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* **2002**, *6* (2), 145-150

35. (a) Schmid, R. D.; Verger, R., Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Edit.* **1998**, *37* (12), 1609-1633; (b) Miled, N.; Beisson, F.; de Caro, J.; de Caro, A.; Arondel, V.; Verger, R., Interfacial catalysis by lipases'. *J Mol Catal B-Enzym* **2001**, *11* (4-6), 165-171.

36. (a) Overbeeke, P. L. A.; Govardhan, C.; Khalaf, N.; Jongejan, J. A.; Heijnen, J. J., Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *J Mol Catal B-Enzym* **2000**, *10* (4), 385-393; (b) Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Brocca, S.; Lotti, M., Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugosa* lipase isoform 1 in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86* (2), 236-240; (c) Secundo, F.; Carrea, G.; Tarabiono, C.; Gatti-Lafranconi, P.; Brocca, S.; Lotti, M.; Jaeger, K. E.; Puls, M.; Eggert, T., The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *J Mol Catal B-Enzym* **2006**, *39* (1-4), 166-170.
37. (a) Peters, G. H.; vanAalten, D. M. F.; Edholm, O.; Toxvaerd, S.; Bywater, R., Dynamics of proteins in different solvent systems: Analysis of essential motion in lipases. *Biophys J* **1996**, *71* (5), 2245-2255; (b) Jaaskelainen, S.; Verma, C. S.; Hubbard, R. E.; Linko, P.; Caves, L. S. D., Conformational change in the activation of lipase: An analysis in terms of low-frequency normal modes. *Protein Science* **1998**, *7* (6), 1359-1367; (c) Peters, G. H.; Bywater, R. P., Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in *Rhizomucor miehei* lipase. *Protein Eng* **1999**, *12* (9), 747-754; (d) Peters, G. H.; Bywater, R. P., Influence of a lipid interface on protein dynamics in a fungal lipase. *Biophys J* **2001**, *81* (6), 3052-3065; (e) Jensen, M. O.; Jensen, T. R.; Kjaer, K.; Bjornholm, T.; Mouritsen, O. G.; Peters, G. H., Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations. *Biophys J* **2002**, *83* (1), 98-111; (f) Peters, G. H.; Bywater, R. P., Essential motions in a fungal lipase with bound substrate, covalently attached inhibitor and product. *J Mol Recognit* **2002**, *15* (6), 393-404; (g) Tejo, B. A.; Salleh, A. B.; Pleiss, J., Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: the role of organic solvent. *J Mol Model* **2004**, *10* (5-6), 358-366; (h) Cherukuvada, S. L.; Seshasayee, A. S. N.; Raghunathan, K.; Anishetty, S.; Pennathur, G., Evidence of a double-lid movement in *Pseudomonas aeruginosa* lipase: Insights from molecular dynamics simulations. *Plos Comput Biol* **2005**, *1* (3), 182-189; (i) James, J. J.; Lakshmi, B. S.; Seshasayee, A. S. N.; Gautam, P., Activation of *Candida rugosa* lipase at alkane-aqueous interfaces: A molecular dynamics study. *FEBS Lett.* **2007**, *581* (23), 4377-4383.
38. (a) Guieysse, D.; Sandoval, G.; Faure, L.; Nicaud, J. M.; Monsan, P.; Marty, A., New efficient lipase from *Yarrowia lipolytica* for the resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters. *Tetrahedron-Asymmetr* **2004**, *15* (22), 3539-3543; (b) Guieysse, D.; Cortes, J.; Puech-Guenot, S.; Barbe, S.; Lafaquiere, V.; Monsan, P.; Simeon, T.; Andre, I.; Remaud-Simeon, M., A structure-controlled investigation of lipase enantioselectivity by a path-planning approach. *Chembiochem* **2008**, *9* (8), 1308-17.
39. Barbe, S.; Lafaquière, V.; Guieysse, D.; Monsan, P.; Remaud-Siméon, M.; André, I., Insights into lid movements of *Burkholderia cepacia* lipase inferred from molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2009**, *77* (3), 509-523.
40. Cedrone, F.; Ménez, A.; Quéméneur, E., Tailoring new enzyme functions by rational redesign. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10* (4), 405-410.

41. Scheib, H.; Pleiss, J.; Stadler, P.; Kovac, A.; Potthoff, A. P.; Haalck, L.; Spener, F.; Paltauf, F.; Schmid, R. D., Rational design of *Rhizopus oryzae* lipase with modified stereoselectivity toward triacylglycerols. *Protein Eng* **1998**, *11* (8), 675-82.
42. Liu, H.; Talmud, P. J.; Lins, L.; Brasseur, R.; Olivecrona, G.; Peelman, F.; Vandekerckhove, J.; Rosseneu, M.; Labeur, C., Characterization of recombinant wild type and site-directed mutations of apolipoprotein C-III: lipid binding, displacement of ApoE, and inhibition of lipoprotein lipase. *Biochemistry* **2000**, *39* (31), 9201-12.
43. Razzaghi, H.; Day, B. W.; McClure, R. J.; Kamboh, M. I., Structure-function analysis of D9N and N291S mutations in human lipoprotein lipase using molecular modelling. *J Mol Graph Model* **2001**, *19* (6), 487-94, 587-90.
44. Manetti, F.; Mileto, D.; Corelli, F.; Soro, S.; Palocci, C.; Cernia, E.; D'Acquarica, I.; Lotti, M.; Alberghina, L.; Botta, M., Design and realization of a tailor-made enzyme to modify the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* lipase. *Bba-Protein Struct M* **2000**, *1543* (1), 146-158.
45. Funke, S. A.; Otte, N.; Eggert, T.; Bocola, M.; Jaeger, K. E.; Thiel, W., Combination of computational prescreening and experimental library construction can accelerate enzyme optimization by directed evolution. *Protein Engineering Design & Selection* **2005**, *18* (11), 509-514.
46. Jaeger, K. E.; Eggert, T., Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15* (4), 305-13.
47. (a) Bolon, D. N.; Voigt, C. A.; Mayo, S. L., De novo design of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6* (2), 125-129; (b) Morley, K. L.; Kazlauskas, R. J., Improving enzyme properties: when are closer mutations better? *Trends Biotechnol.* **2005**, *23* (5), 231-237.
48. (a) Müller, M., Chemical diversity through biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15* (6), 591-598; (b) Kazlauskas, R. J., Enhancing catalytic promiscuity for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9* (2), 195-201; (c) Khersonsky, O.; Roodveldt, C.; Tawfik, D. S., Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10* (5), 498-508; (d) Hult, K.; Berglund, P., Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25* (5), 231-238.
49. Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (4), 874-875.
50. Carlqvist, P.; Svedendahl, M.; Branneby, C.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P., Exploring the active-site of a rationally redesigned lipase for catalysis of Michael-type additions. *ChemBiochem* **2005**, *6* (2), 331-336.

51. (a) Tomic, S.; Dobovicnik, V.; Sunjic, V.; Kojic-Prodic, B., Enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase towards 2-methyl-3(or 4)-arylalkanols: An approach based on the stereoelectronic theory and molecular modeling. *Croat Chem Acta* **2001**, *74* (2), 343-357; (b) Tomic, S.; Kojic-Prodic, B., A quantitative model for predicting enzyme enantio selectivity: application to *Burkholderia cepacia* lipase and 3-(aryloxy)-1,2-propanediol derivatives. *J Mol Graph Model* **2002**, *21* (3), 241-252; (c) Tomic, S.; Bertosa, B.; Kojic-Prodic, B.; Kolosvary, I., Stereoselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase towards secondary alcohols: molecular modelling and 3D QSAR approach. *Tetrahedron-Asymmetr* **2004**, *15* (7), 1163-1172.
52. Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S., GRid-INdependent descriptors (GRIND): A novel class of alignment-independent three-dimensional molecular descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (17), 3233-3243.
53. Cruciani, G.; Pastor, M.; Guba, W., VolSurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci* **2000**, *11*, S29-S39.
54. Braiuca, P.; Boscarol, L.; Ebert, C.; Linda, P.; Gardossi, L., 3D-QSAR applied to the quantitative prediction of penicillin G amidase selectivity. *Adv Synth Catal* **2006**, *348* (6), 773-780.
55. Braiuca, P.; Lorena, K.; Ferrario, V.; Ebert, C.; Gardossi, L., A Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship (3D-QSAR) Model for Predicting the Enantioselectivity of *Candida antarctica* Lipase B. *Adv Synth Catal* **2009**, *351* (9), 1293-1302.
56. Carballeira, J. D.; Quezada, M. A.; Alvarez, E.; Sinisterra, J. V., High throughput screening and QSAR-3D/CoMFA: Useful tools to design predictive models of substrate specificity for biocatalysts. *Molecules* **2004**, *9* (8), 673-693.
57. Sanchez-Montero, J. M.; Sinisterra, J. V., Biocatálisis aplicada a la Química Farmacéutica. *An. R. Acad. Nac. Farm.* **2007**, *73* (4), 1199-1236.
58. Woodley, J. M.; Bisschops, M.; Straathof, A. J. J.; Ottens, M., Future directions for in-situ product removal (ISPR). *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2008**, *83* (2), 121-123.